

に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中のS1Pに対して遊走することにより血中へ再還流するシステムが存在する。この流入のバランスの上に骨表面に存在する前駆細胞数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟する(図2)。これまで、RANKLなどの分化誘導因子やその下流にある転写制御機構の解明が破骨細胞研究の主要な課題であったが、この研究はその前の段階、すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所(骨)へと遊走・位置決めを行うシステムが、破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新概念を提唱するものである。

今後の展開

1. 破骨前駆細胞の遊走・位置決めを標的とした新しい創薬

この新しい調節点は、骨吸収疾患に対する創薬ターゲットとしても極めて魅力的である。我々は骨粗鬆症の動物モデル(卵巣摘出マウス)を用いて、S1P受容体に対する強力なアゴニストの投与が、破骨前駆細胞を骨表面から引き剥がし血中へ再還流させ(結果として骨表面上の破骨細胞の数を減らし)、骨吸収を抑制することを示した。この結果は、S1Pによる破骨前駆細胞の遊走制御が、治療標的としても有望なものであることを示している¹⁷⁾。これは、ビスフォスフォネート製剤など成熟破骨細胞を標的とした従来の骨吸収抑制剤とは異なった作用機序を

もっていることから、併用投与による相乗効果も期待でき、今後の臨床応用が期待される。

2. 破骨前駆細胞を骨表面に引き寄せる因子は何か?

我々は、S1Pが単球系破骨前駆細胞を骨表面から血中へ再還流させる因子“circulation-attractant”であることを明らかにした。それでは逆に骨へと引き寄せる因子“bone-attractant”は何であろうか? 過去の研究からその候補はすでに挙げられており、たとえば、骨髄ストローマ細胞が発現するCXCL12は*in vitro*において破骨前駆細胞のケモタキシスを刺激することが示されている²¹⁾²²⁾。しかしながら、*in vivo*においてこれらが実際に機能しているかどうかについては不明である。

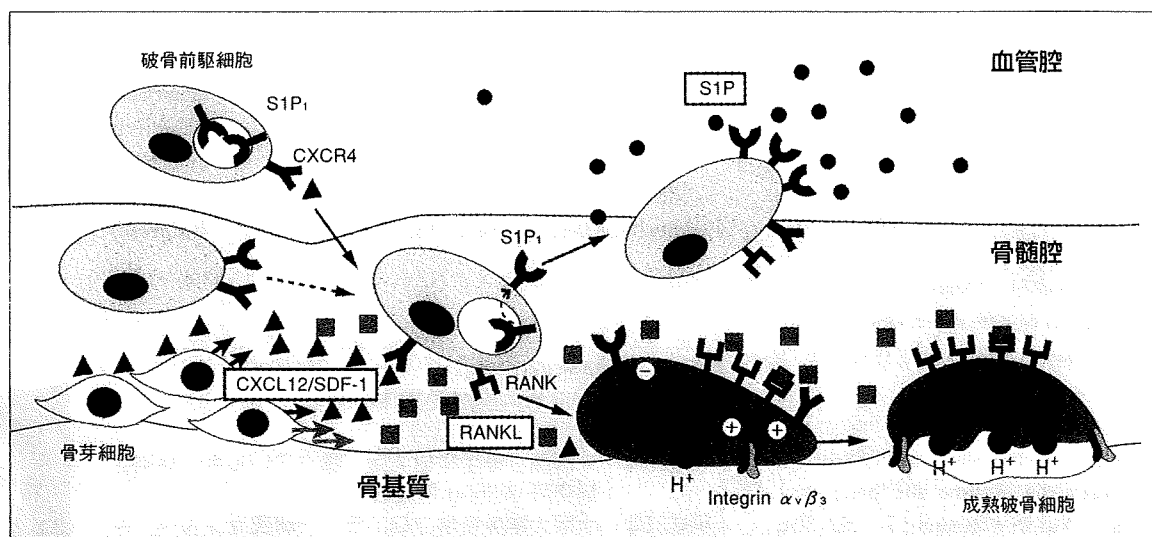


図2 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

単球系破骨前駆細胞は、骨髄内にあるケモカインSDF-1/CXCL12によって骨質内へ引き寄せられ、逆に血中のS1Pによって血管内へと再還流する。この流入のバランスの上に骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟破骨細胞へと分化する。

我々は現在、骨の生体イメージング系を用いて、CXCL12やその他の候補のケモカインを中心に、生理的なbone-attractantの検索を行っている。

3. 骨組織の生体二光子励起観察の応用

骨組織は、破骨細胞や骨芽細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、Bリンパ球をはじめとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとって重要な部位である。骨髓腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御や、血液系幹細胞が多能性を維持する特殊な環境(ニッチ)の同定、さらには癌の骨転移のように、本来骨にいない細胞が如何にして骨に到達するのか(誰が手助けするのか)など、骨組織・骨髓腔に関しては解明されるべき課題が数多くある。我々が開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨の生体イメージングの方法論は、これら残された疑問を解決する強力な手段になると考える。

文 献

- 1) Teitelbaum SL : Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289** : 1504-1508, 2000
- 2) Teitelbaum SL, Ross FP : Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* **4** : 638-649, 2003
- 3) Takayanagi H : Osteoimmunology ; shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7** : 292-304, 2007
- 4) Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y : Osteoimmunology ; interactions of

the bone and immune system. *Endocr Rev* **29** : 403-440, 2008

- 5) Goepfert-Mayer M : Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* **9** : 273-295, 1931
- 6) Denk W, Strickler JH, Webb WW : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248** : 73-76, 1990
- 7) Denk W, Svoboda K : Photon upmanship ; why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* **18** : 351-357, 1997
- 8) Helmchen F, Denk W : Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* **2** : 932-940, 2005
- 9) Takahashi N, Kasai H : Exocytic process analyzed with two-photon excitation imaging in endocrine pancreas. *Endocr J* **54** : 337-346, 2007
- 10) Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, et al : Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* **297** : 1349-1352, 2002
- 11) Huang AY, Qi H, Germain RN : Illuminating the landscape of *in vivo* immunity ; insights from dynamic *in situ* imaging of secondary lymphoid tissues. *Immunity* **21** : 331-339, 2004
- 12) Stoll S, Delon J, Brotz TM, et al :

Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296** : 1873-1876, 2002

- 13) Miller MJ, Wei SH, Parker I, et al : Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* **296** : 1869-1873, 2002
- 14) Bousso P, Bhakta NR, Lewis RS, et al : Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* **296** : 1876-1880, 2002
- 15) von Andrian UH : Immunology. T cell activation in six dimensions. *Science* **296** : 1815-1817, 2002
- 16) Germain RN, Bajenoff M, Castellino F, et al : Making friends in out-of-the-way places ; how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev* **221** : 163-181, 2008
- 17) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al : Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* **458** : 524-528, 2009
- 18) Klauschen F, Ishii M, Qi H, et al : Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Methods*, 2009 (in press)

石井 優(Masaru Ishii)

平成10年 大阪大学医学部医学科卒業
平成17年 医学博士(大阪大学)
平成18年 米国国立衛生学研究所・国立アレルギー感染症研究所 Visiting Fellow
平成21年 大阪大学免疫学フロンティア研究センター・生体イメージング研究室・主任研究者(准教授)



8. 破骨細胞前駆細胞の遊走・局在制御—二光子励起顕微鏡を用いた骨免疫イメージングより—

- 19) Rosen H, Goetzl EJ : Sphingosine 1-phosphate and its receptors ; an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* **5** : 560-570, 2005
- 20) Cyster JG : Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* **23** : 127-159, 2005
- 21) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, et al : Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* **18** : 1404-1418, 2003
- 22) Kollet O, Dar A, Shvitiel S, et al : Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* **12** : 657-664, 2006

Visual
Review
ビジュアルレビュー

脂質メディエーターによる破骨細胞 前駆細胞の遊走・位置決めの制御

— 生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の
*in vivo*イメージングより —

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 生体イメージング研究室

石井 優

感染・炎症・免疫 第39巻 第3号 別刷

平成21年10月10日発行

東京 医薬の門社

脂質メディエーターによる破骨細胞 前駆細胞の遊走・位置決めの制御

— 生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の
in vivo イメージングより —

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 生体イメージング研究室

石井 優

破骨細胞は単球系細胞から分化して骨を吸収する特殊な細胞である。

単球系破骨前駆細胞がいかんして骨表面に到達するか、

その遊走がどう制御されているかは長い間不明であった。

我々は最近、二光子励起顕微鏡を用いて生きたままのマウス骨組織内を可視化することに成功し、

破骨前駆細胞の遊走・接着が¹、脂質メディエーターの一種であるスフィンゴシン1リン酸や

種々のケモカインによって動的に制御されていることを解明した。

本稿ではこの研究成果に加え、我々が²開発した骨の *in vivo* イメージングの

方法論や応用について概説する。

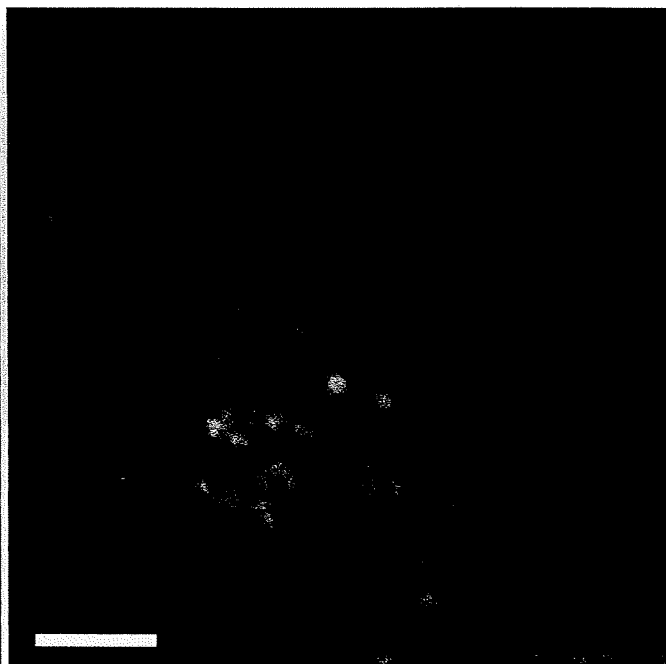
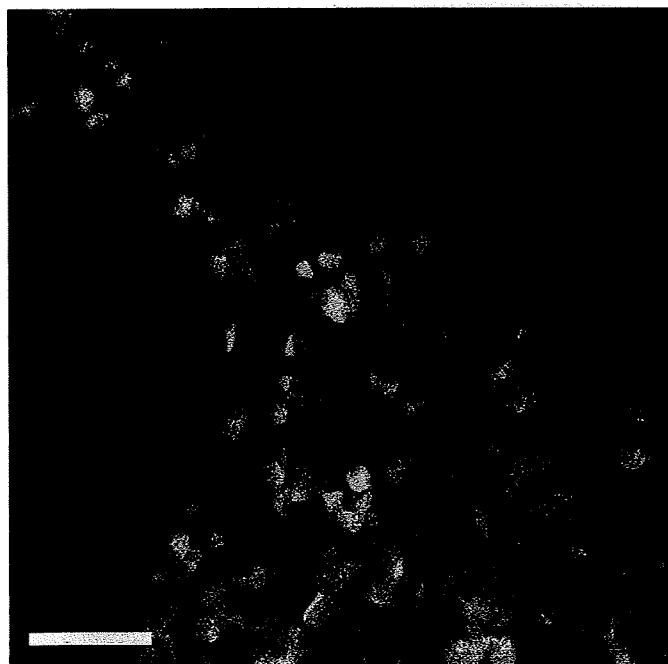


写真1 骨組織(骨髄内)のライブイメージング

LysM-EGFP transgenic mouse (左側)またはCSF1R-EGFP transgenic mouse (右側)の骨髄腔の生体二光子励起顕微鏡による観察像。Texas Redをconjugateした高分子デキストランを静脈注射することで骨髄内の血管構造を可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する(筆者HPなどを参照)。スケールバー: 30 μ m。

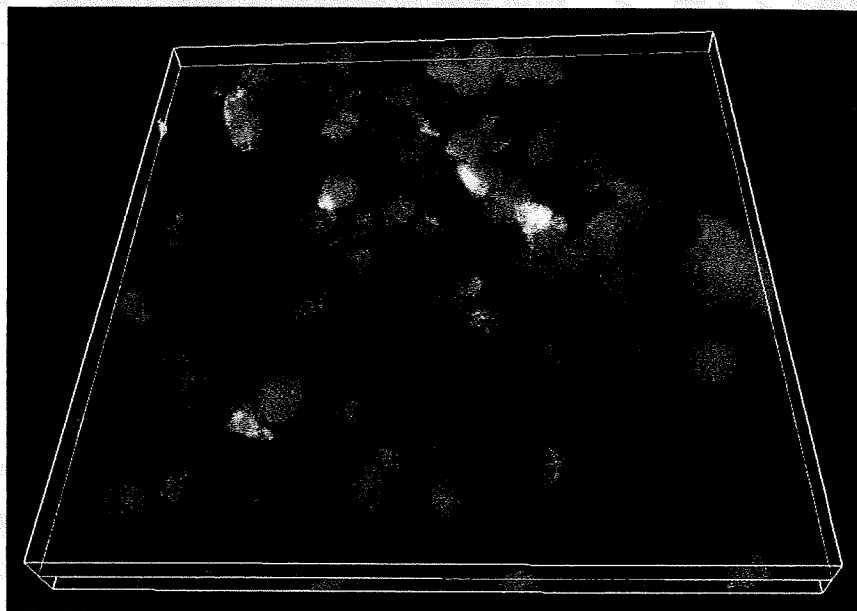


写真2 骨髓腔の3Dイメージ1

緑色: CSF1R-EGFP⁺細胞, 赤色: 微小血管壁の免疫染色. 骨髓腔内には毛細血管床が網目のように存在している.

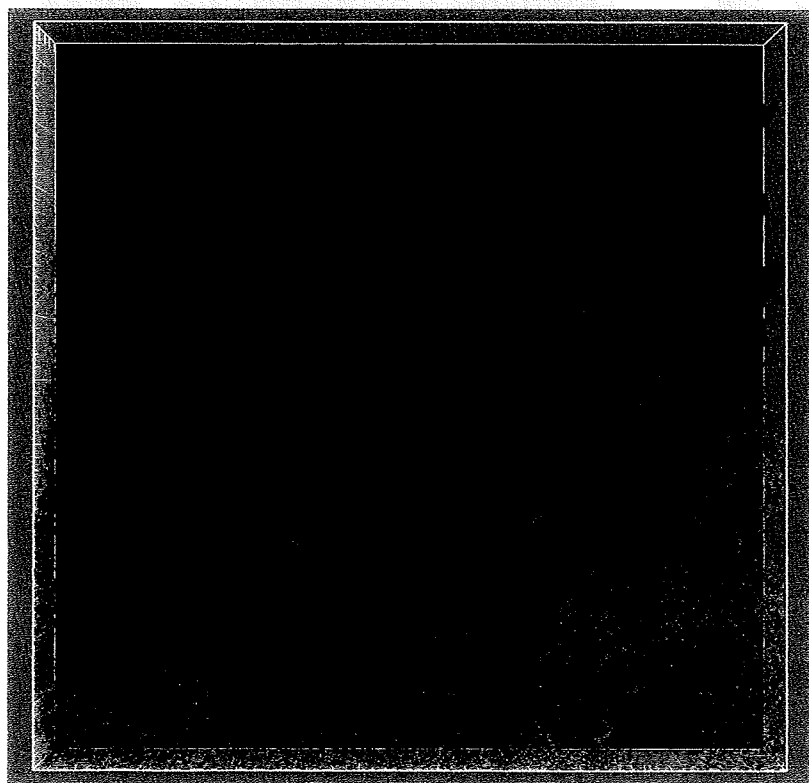


写真3 骨髓腔の3Dイメージ2

CSF1R-EGFP⁺細胞(緑色)と β -actin-DsRed2⁺細胞(赤色)からなる骨髓キメラマウスのイメージング. 青色の部分は骨基質によるsecond harmonic generation.

脂質メディエーターによる破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決め制御 — 生体二光子励起顕微鏡を用いた骨組織の *in vivo* イメージングより —

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 生体イメージング研究室*

石井 優

はじめに

硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来、生きたままでの観察が極めて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨を、カルシウムキレート剤に1週間ほど漬けて脱灰し、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「形態」や「分子発現」(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の「動き」である。細胞の動きを見るためには、どうしても生きた細胞を生きた組織の中で観察する必要がある。さらに、骨髄腔のように、豊富な血管床による血流を保ったまま、そこで流入・流出する細胞の動きを捉えることが重要な場所では、「摘出して生かした」骨組織ではなく、「生きたままの個体の中」の骨組織を観察する必要がある。

我々は最近、二光子励起顕微鏡を駆使してマウスを生かしたまま骨組織内を観察するイメージング方法を確立させた(写真1)。この方法を用いると、骨組織のリモデリングに関わる破骨細胞や骨芽細胞、骨髄内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きた動きを、リアルタイムで観察することができる。我々は特に、骨を破壊・吸収する働きをもつ破骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、この前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、種々のケモカインや脂質メディエーター(スフィンゴシン1リン酸)によって動的に調節されていることを明らかにした。

本稿では、これら最新の研究成果の解説に加えて、骨組織内の二光子励起ライブイメージングの

方法論や、その免疫学・細胞生物学分野における今後の応用と将来性について、実際の画像を紹介しながら概説したい。

イントロ：破骨細胞はどこから来て、何者で、どこへ行くのか？

骨組織では、日々、古い骨が「破骨細胞」によって壊され、「骨芽細胞」によって新しい骨が作られて、新陳代謝が維持されている。骨は硬そうで、一旦できたら変わらない組織に見えるが、厳密に言えば昨日の骨と今日の骨は別物である。加齢や炎症などによって破骨細胞の働きが異常に活性化し、破骨細胞と骨芽細胞の働きのバランスが崩れる骨吸収側に傾くと、骨粗鬆症や関節リウマチなど、いわゆる骨吸収性疾患の発症へとつながる。

骨芽細胞は骨内に恒常的に存在する間葉系由来の細胞であるが、破骨細胞は血液(単球)系の前駆細胞が、前駆細胞が骨表面に到達して、その場で最終分化を遂げて骨吸収能をもつ成熟破骨細胞となる。しかしながら、破骨細胞と骨芽細胞は単純なライバル関係ではなく、その動きは相互に緊密に関連している。例えば、骨表面で破骨前駆細胞が成熟破骨細胞へと分化するために必須の因子であるRANKL(Receptor activator of NF- κ B - ligand)は、骨芽細胞が発現している。この、RANKLの発見を始めとして、これまで国内外での精力的な研究の結果、破骨細胞の分化・成熟に関わる機構について多くの事実が解明されてきた。その一方で、未解明の大きな疑問が残されていた。それは「破骨細胞はどうやって骨表面に到達するのか」であった。

RANKLは骨組織以外の組織にも発現が見られるが、その他の組織では破骨細胞は見られない。ま

たRANKLを欠損したマウスでは、成熟破骨細胞の形成が完全に阻害されているが、このマウスに recombinant のRANKLを投与すると破骨細胞への分化がrescueされる。このとき興味深いことに、成熟破骨細胞は基本的に骨表面にしかできない。これは、骨表面には(骨芽細胞による)RANKLの発現以外に、破骨前駆細胞を引き寄せて、成熟させるのに適した特別な環境(破骨細胞ニッチとも呼ぶべき)が存在することを強く示唆している。

我々は、破骨前駆細胞がいかにして骨表面へ到達するのか、またその遊走・位置決めがどのように制御されているかについて解明するために、まず、種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を動かし得るかどうか *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、スフィンゴシン1リン酸を始めとした、いくつかの候補分子を得た。しかしながら、次の研究段階として、「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨前駆細胞を動かすのかどうか」を解決する必要がある。このため、二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察することに挑戦した。

骨組織の生体二光子励起顕微鏡観察

1. 二光子励起顕微鏡はなぜ生きた組織の観察に適しているか？

二光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察(共焦点レーザー顕微鏡も含む)で用いる励起光の半分のエネルギー(=2倍の波長)をもったレーザー光を、細かいパルス状に放出したものを励起光源に用いる。パルス状の光子はフォーカスで一点に集められ密度が高い状態となり、二光子励起[=通常(一光子励起)では光子1個で励起する蛍光分子を、光子2個分で励起すること]が起こりうる。このため、二光子励起顕微鏡の特長として以下の2点が挙げられる。

①高いz軸解像度：フォーカス平面のみでしか励起が起こらない[その他のz軸平面では(通常の励起

に必要な半分のエネルギーの)光子が当たっているものの励起には至らない]。

②高い組織透過性：励起光として通常の半分のエネルギー(2倍の波長)の近赤外光(通常は波長が780~1,000nm)を用いるため、組織の深部まで光を到達させることができる(※「ホイヘンスの原理」：波長が長いほど障害物を越えて行きやすい。テレビの赤外線リモコンは障子を通過するが、紫外線は紙一枚で容易にカットできる)。

固定した組織・臓器は、薄切してプレパラートにすれば、あらゆる断面を観察することができるが(物理的スライス)、生きた丸ごとの組織の内部を観察するには、二光子励起顕微鏡を用いて、深部組織でz軸平面を変えて観察することが極めて有用である(光学的スライス)。このため、生きた組織の観察手段として、二光子励起顕微鏡が最近国内外で多用されつつある。例えば、動物の脳や分泌腺など臓器・組織を摘出して、培養液中で生かしながら二光子励起観察されてきた(tissue-explant two-photon imaging)¹⁾。

2. 「生体」二光子励起観察のメリット

免疫系は、特に細胞の動きが重要なシステムである。好中球やマクロファージなどの抗原提示細胞や細胞性免疫を担うリンパ球が、感染局所や全身をくまなく遊走し、リンパ組織間内の微小環境で会合し、互いに信号を伝達することにより、免疫機能が維持されている。これら細胞遊走は時空間的に精緻にコントロールされており、各細胞が適切な場所に適切な時間に存在しなければ、機能を十分に発揮できない。これら免疫系における統率された細胞遊走システムは、神経系での固定した軸索システム(“hard-wired”)と比較して、“soft-wired”と形容される。このようなシステムの解析のため、二光子励起観察をさらに一步進めて、実験動物を生かしたまま顕微鏡に乗せて、注目する組織を観察する“intravital two-photon microscopy(生体二光子励起顕微鏡観察)”の手法が、2002年頃より海外の複数の研究者によって開発された^{2, 3)}。この方

法論では、注目する組織のみならず、個体自体が生きており、全身の血流や代謝が保たれた状態で観察できるため、極めて情報量が多い。

骨組織内での破骨前駆細胞の遊走・位置決めを観察するために、我々は骨内・骨髓腔の“intravital” imagingに取り組んだ。この方法では、骨髓腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨組織に定着している細胞の動きのみならず、血管から骨髓内へ細胞が流入したり、逆に血中へ還流していく様子を観察することができる。さらには、薬剤を尾静脈などから全身投与すると血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。このような長所から、我々は骨の tissue explant imaging では intravital imaging を行ったが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出して観察することはかなり難しい。

3. 骨組織の生体イメージングの実際

骨基質に含まれるリン酸カルシウム結晶は、励起光を容易に散乱させるため、二光子励起に用いる近赤外線レーザーを用いても深部まで到達させることは難しい。現在の近赤外線レーザーでは軟部組織であれば表面から800~1,000 μm まで到達が可能であるが、骨組織の場合は、150~200 μm が限界である。このため我々は、骨基質が薄くて骨表面から骨髓腔まで80~120 μm で到達できる、マウスの頭頂骨をイメージングに用いた。

破骨前駆細胞のイメージングに関しては、その蛍光標識の方法にも難点があった。例えばリンパ球のリンパ節内などでの intravital imaging では、あるマウスから細胞を取り出して *ex vivo* で蛍光ラベル(細胞透過性の蛍光色素が各種存在する)して、これを別のマウスに adoptive transfer すると、リンパ節内に蛍光ラベルしたリンパ球が多数観察される。しかし、同様の手法は破骨前駆細胞などの骨髓球系の細胞に関しては、うまくいかない。このため、我々は可視化したい細胞に特異的に蛍光分子を発現させたトランスジェニックマウスを用いて実験を行った。例えば、破骨前駆細胞を含む単

球系細胞のイメージングには、CSF1R (M-CSF/CSF-1 の受容体) や CX₃CR1 (CX₃CL1/fractalkine の受容体) のプロモーター下で EGFP を発現するマウス、顆粒球系のイメージングには、Lysozyme M プロモーター下 EGFP 発現トランスジェニックマウス、などを用いた。これらの問題点としては、蛍光分子の発現が、完全に細胞系統特異的とはなっていないことである(例えば Lysozyme M-EGFP transgenic であれば、EGFP の発現は顆粒球以外にも、一部マクロファージやNK細胞などにも見られる)。長所は、adoptive transfer とは違って、元々その組織・臓器に居た状態での細胞を観察できるので、よりインタクトな細胞現象を観察できる点である。

脂質メディエーター S1P による破骨前駆細胞の遊走と位置決めの制御

種々のケモカイン・脂質メディエーターを *in vitro* でスクリーニングした結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激するいくつかの分子を得たが、中でも我々が注目したものは、現在リンパ球の遊走制御について重要な知見が得られているスフィンゴシン1リン酸(S1P)である。S1Pは主に赤血球や血小板によって作られるため血中に豊富に存在する。一方、組織にはS1Pを分解するS1Pリアーゼがubiquitousに発現しており、一般にS1Pは血中で高く、組織で低い濃度に保たれている。このため、S1Pに対する細胞遊走(ケモタキシス)は、基本的には細胞が組織から血中へ還流する際に作用すると考えられている。

我々は、破骨前駆細胞がS1Pに対する受容体(S1P₁)を発現しており、*in vitro* でS1Pに対して強いケモタキシスが惹起されることを見出した。このS1Pに対する細胞遊走が*in vivo*でも見られるかどうかを確認するために、二光子励起顕微鏡を用いて骨組織内部の生体観察を行った^{4, 5}。骨組織にある破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CSF1R-EGFP⁺またはCX₃CR1-EGFP⁺)は、定常状態ではほとんど

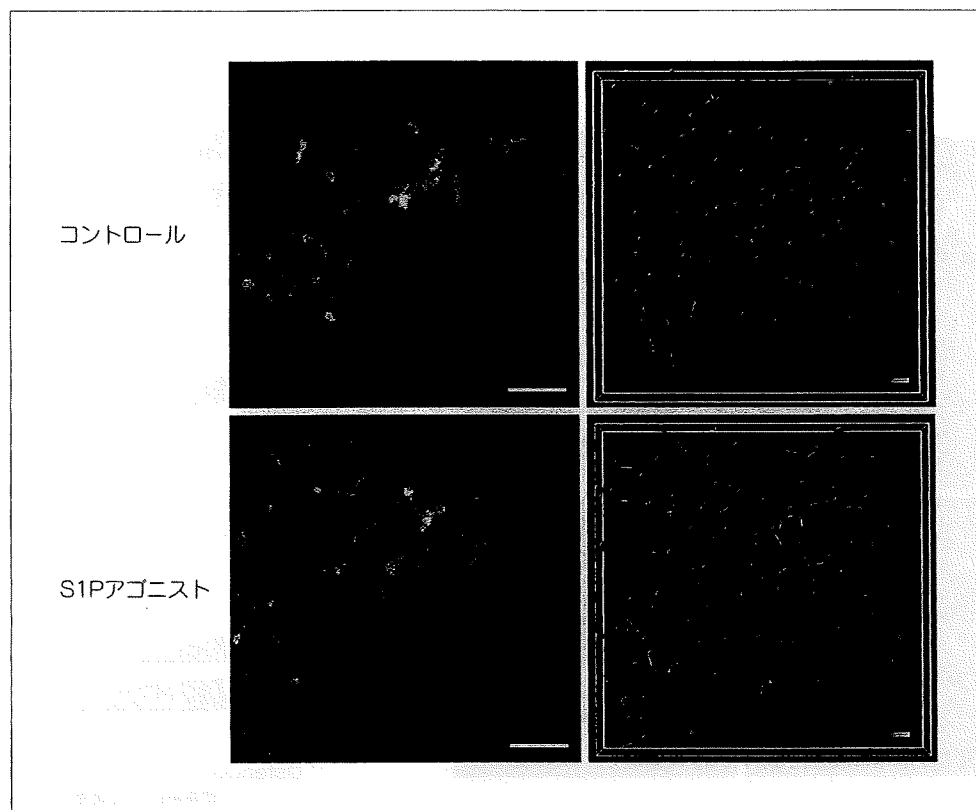


図1 骨組織内での破骨前駆細胞のライブイメージング

破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CX₃CR1-EGFP⁺)を緑色でラベルして、TexasRedをconjugateした高分子デキストラン(〜70kDa)を静注して血管構造を赤色でラベルして、それぞれ可視化している(左)。また、各細胞を球体に置き換え、軌道を書いて速度を計算している(右)。定常状態では単球系細胞はほとんど静止しているのに対し(上部2パネル)、S1PアゴニストであるSEW2871を投与すると、急速に細胞の運動能力が亢進し、血中へ還流していく様子が観察される(文献5より一部改変)。

動かなかったが、S1P₁受容体に対する強力なアゴニストであるSEW2871を経静脈的に投与すると、急速に動きが大きくなり、血管へと移行していく様子が観察された(図1;参考文献5のsupplementary videosや、著者の研究室HP参照)。これにより、*in vivo*の骨組織内でも確かにS1P受容体刺激に反応して遊走能力が亢進することが証明された。

さらに我々は、この「S1Pに対する破骨前駆細胞の遊走」の生理意義を解明するために、破骨前駆細胞を含む単球系細胞(CD11b⁺)に特異的にS1P受容体(S1P₁)を欠損させたマウスの解析を行った(図2)。S1P₁を欠損した破骨前駆細胞は骨組織に留まりやすくなり、その結果として骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収側へと傾くこ

とが分かった。S1Pの濃度が血中で高く、S1Pに対する遊走が一般に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中のS1Pに対して遊走することにより血中へ再還流するシステムが存在する。この流入のバランスの上に骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟破骨細胞へと分化する(図3)。これまで、RANKLなどの分化誘導因子や、その下流にある転写制御が、破骨細胞研究の主要な課題であったが、我々の研究は、その前の段階すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所(骨)へと遊

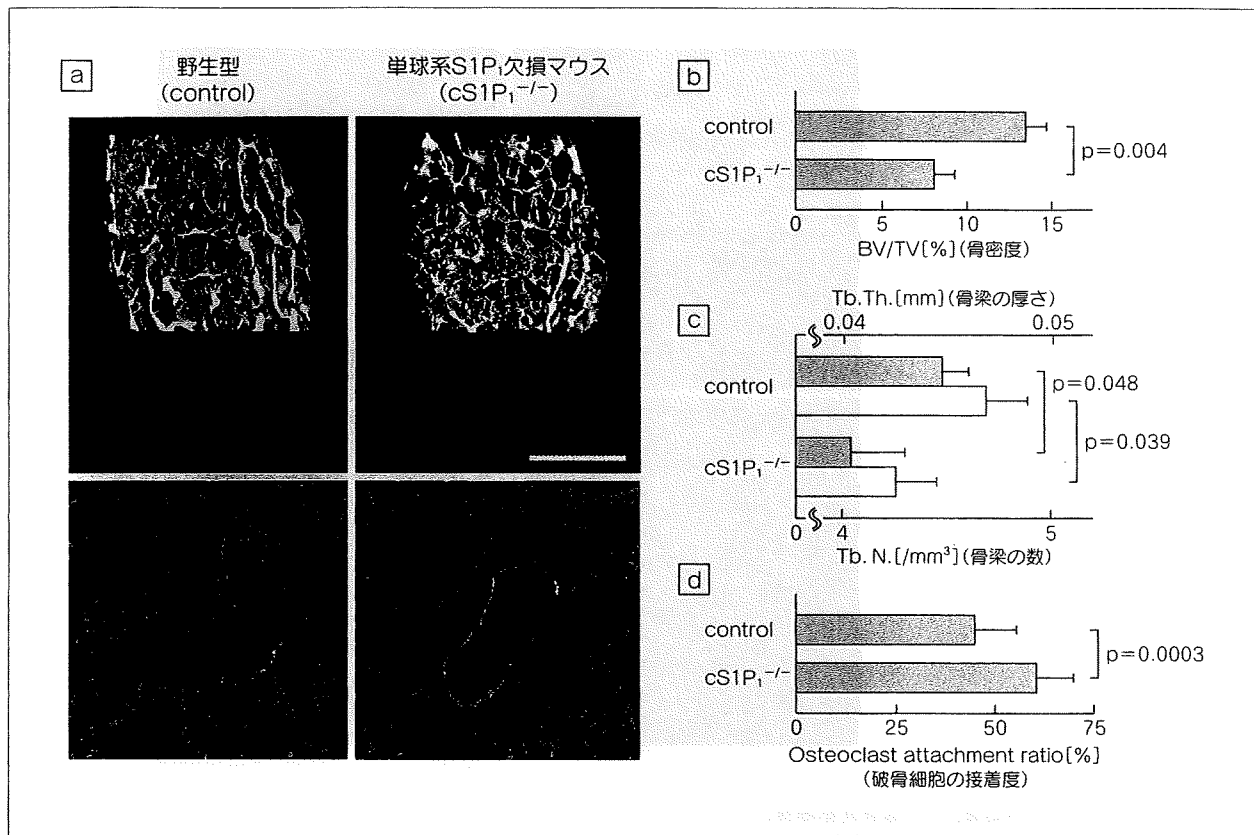


図2 単球・破骨細胞特異的S1P受容体(S1P₁)欠損マウスの骨組織の解析
 (a) 破骨細胞を含む単球系細胞(CD11b⁺)のみS1P受容体(S1P₁)を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの骨組織の解析。マイクロCT画像(上段)と、骨表面への破骨細胞接着度の自動計算画像(下段)。(b) BV/TV(=bone volume/total volume:骨密度)。(c) Tb.Th.(=trabecular thickness:骨梁の厚さの平均)。(d) Tb.N.(=trabecular number per volume:単位体積当たりの骨梁の数)。(e) 破骨細胞の接着度(文献5より一部改変)。

走・位置決めを行うシステムが、破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新しい概念を提唱するものである。

今後の展開 I : 破骨前駆細胞を骨表面に引き寄せる因子は何か?

我々は、S1Pが単球系破骨前駆細胞を骨表面から血中へ再還流させる因子“circulation-attractant”であることを明らかにした。それでは逆に、血中にある前駆細胞を骨へと引き寄せる因子“bone-attractant”は何であろうか?すでに過去に候補は挙げられており、例えば、骨髄ストロマ細胞が発現するCXCL12/SDF-1は*in vitro*で破骨前駆細胞の

ケモタキシスを刺激することが示されている⁶⁾。しかしながら、*in vivo*でこれらが実際に機能しているかどうかについては不明である。我々は現在、骨の生体イメージング系を用いて、CXCL12やその他の候補のケモカインを中心に、生理的なbone-attractantの検索を精力的に行っている。

今後の展開 II : 骨組織の生体二光子励起観察の応用

骨組織は、破骨細胞や骨芽細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、Bリンパ球を始めとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとって重要な部位である。骨髄腔内での各細胞の挙動・位置

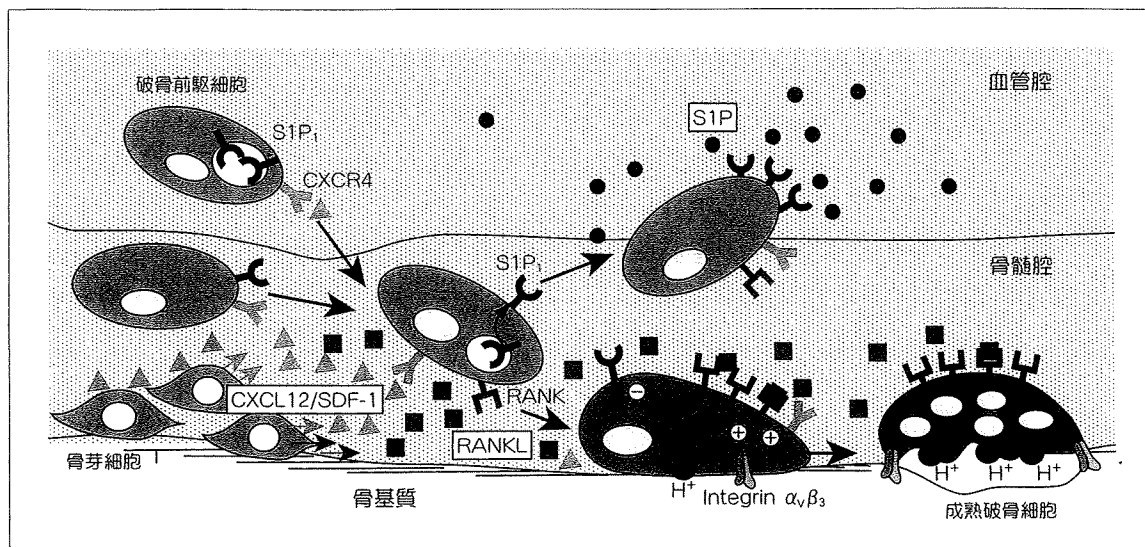


図3 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構

単球系破骨前駆細胞は、骨髓内にあるケモカインSDF-1/CXCL12によって骨質内へ引き寄せられ、逆に血中のS1Pによって血管内へと再還流する。この流出入のバランスの上に骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数がRANKLの刺激を受け成熟破骨細胞へと分化する。

決めとその分化制御や、血液系幹細胞が多能性を維持する特殊な環境(ニッチ)の同定、さらには癌の骨転移のように、本来骨にいない細胞が如何にして骨に到達するのか(誰が手助けするのか)など、骨組織・骨髓腔に関しては解明されるべき基本的課題が数多く存在する。我々が開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨の生体イメージングの方法論は、これらの残された謎を解決する強力な手段となると考えている。

参考文献

- 1) Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, *et al.* Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 2002; 297: 1349-52.
- 2) Stoll S, Delon J, Brotz TM, *et al.* Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 2002; 296: 1873-6.
- 3) Miller MJ, Wei SH, Parker I, *et al.* Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 2002; 296: 1869-73.
- 4) Germain RN, Bajénoff M, Castellino F, *et al.* Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev.* 2008; 221: 163-81.
- 5) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, *et al.* Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009; 458: 524-8.
- 6) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1404-18.

最新医学・第64巻・第12号 (2009年12月号 別刷)

トピックス

骨組織のライブイメージングにより明らかとなった 破骨細胞の遊走と位置決めの制御

石井 優

最新医学社

トピックス

骨組織のライブイメージングにより明らかとなった
破骨細胞の遊走と位置決めの制御

石井 優*

はじめに

硬い石灰質に囲まれた骨の中は、これまで生きてきたままの観察が極めて困難であると考えられていた。実際にこれまで骨や骨髄の研究では、固定して摘出した骨をカルシウムキレート剤に1週間ほど漬けてカルシウムを取り除き(脱灰し)、切片にして観察していた。この従来法でも、骨組織内の細胞の「形態」や「分子発現」(免疫染色による)を解析することはできたが、決定的な情報が欠落していた。それは細胞の「動き」である。細胞の動きを見るためには、どうしても生きて細胞を生きて組織の中で観察する必要がある。特に骨髓腔のように、豊富な血管床による血流を保ったまま、そこで流入する細胞の動きをとらえることが重要な場所では、「摘出して生かした」骨組織ではなく、「生きてきたままの個体中」での骨組織を観察する必要がある。

筆者は最近、「二光子励起顕微鏡」という、組織の奥深くまで観察できる顕微鏡を駆使して、マウスを生かしたままの状態で骨組織内を観察するイメージング法を世界に先駆けて開発した(図1)。この方法を用いると、骨のリモデリングにかかわる破骨細胞や骨芽細胞、骨髓内で分化・成熟を遂げる単球・顆粒球・リンパ球、その他の間葉系細胞や血液幹細胞などの生きて動きを、リアルタイムで観察することができる。我々は特に、骨を破壊・吸収する働きを持つ破

骨細胞の動きと機能に注目して解析を行い、この前駆細胞の骨への遊走・位置決めが、種々のケモカインや脂質メディエーター(スフィンゴシン1リン酸)によって動的に調節されていることを明らかにした。本稿では、これらの研究成果の解説に加えて、骨組織内の二光子励起ライブイメージングの方法論やその今後の応用と将来性について、実際の画像を紹介しながら概説したい。

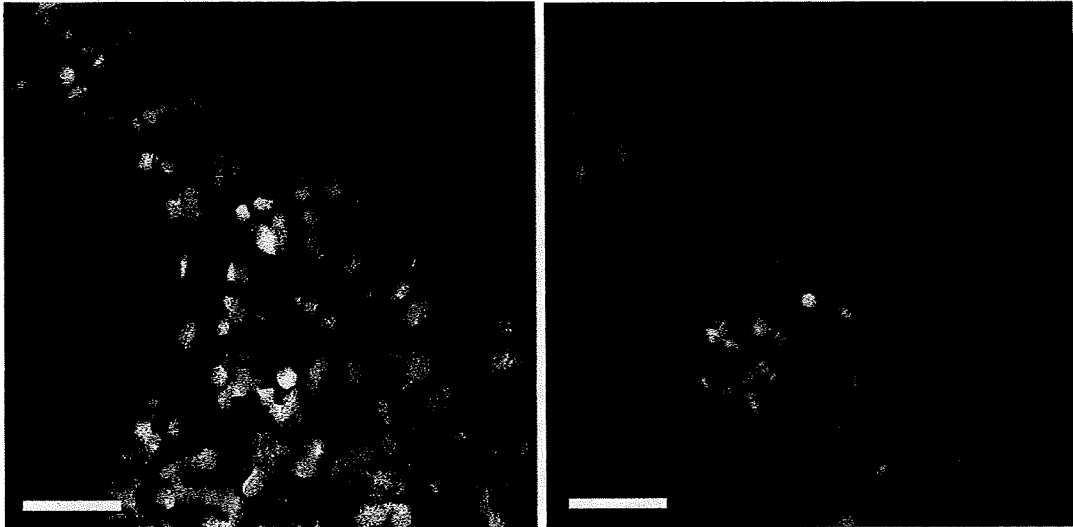
破骨細胞は「どこから来て、何者で、どこへ行くのか？」

骨組織は、古い骨を壊して吸収する「破骨細胞」と、骨を新生する「骨芽細胞」のバランスの取れた働きにより新陳代謝が繰り返されている。骨は、硬そうで一度できたら変わらない組織に見えるが、厳密に言えば昨日の骨と今日の骨は少し違うのである。加齢や炎症などによって破骨細胞の働きが異常に活性化し、破骨細胞と骨芽細胞の働きのバランスが崩れ骨吸収側に傾くと、骨粗鬆症や関節リウマチなどいわゆる骨吸収性疾患の発症へとつながる。特に関節リウマチでは、関節炎局所に活性化した破骨細胞が多数誘導され、骨破壊に関与している¹⁾²⁾。

骨芽細胞は骨内に恒常的に存在する間葉系由来の細胞であるが、破骨細胞は血液(単球)系の前駆細胞が骨表面に遊走してきて、その場所で最終分化を遂げて、骨吸収能を持つ成熟破骨細胞となる。興味深いことに、破骨細胞と骨芽細胞は単純なライバル関係ではなく、その働きは相互に緊密に関連している。例えば、骨表面で破骨前駆細胞が成熟破骨細胞へと分化するた

* 大阪大学免疫学フロンティア研究センター
生体イメージング研究室 主任研究者(准教授)

図1 骨組織（骨髄内）のライブイメージング



好中球（左）または単球（右）がそれぞれ緑色蛍光（GFP）を発現している遺伝子改変マウスの骨髄腔の生体二光子励起顕微鏡による観察像。骨髄内の血管構造は、赤色蛍光（Texas Red）を結合させた高分子デキストランを静脈注射して可視化している。実際の実験ではこれを一定時間間隔で撮影し、動画を作成する（筆者 HP <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/> を参照）。スケールバー：30 μ m

めに必須の因子である receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) は、主に骨芽細胞が発現している³⁰⁾。この RANKL の発見をはじめとして、これまで国内外での精力的な研究の結果、破骨細胞の分化・成熟にかかわる機構について、多くの事実が解明されてきた。その一方で、長らく解決されていなかった重要な謎があった。それは、「破骨細胞（およびその前駆細胞）はどうやって骨表面に到達するのか」である。

RANKL は骨組織以外の組織にも発現が見られるが、その他の組織では破骨細胞は見られない。また、RANKL を欠損したマウスでは成熟破骨細胞の形成が完全に阻害されているが、このマウスにリコンビナントの RANKL を静脈注射すると破骨細胞への分化が回復する。このとき興味深いことに、成熟破骨細胞は骨表面にしかできない。これは、骨表面には（骨芽細胞による）RANKL の発現以外に、破骨前駆細胞を引き寄せて成熟させるのに適した特別な環境（破骨細胞ニッチとも呼ぶべき）が存在するこ

とを強く示唆している。

筆者は、破骨前駆細胞がいかにして骨表面へ到達するのか、またその遊走・位置決めがどのように制御されているかについて解明するために、まず種々のケモカインや脂質メディエーターについて、破骨前駆細胞を動かし得るかどうか *in vitro* の実験系でスクリーニングを行った。その結果、スフィンゴシン1リン酸をはじめとした幾つかの候補分子を得た。しかしながら次の研究段階として、「これらの候補分子が実際に *in vivo* で破骨前駆細胞を動かすのかどうか」を解決する必要がある。このため、二光子励起顕微鏡を用いて生きた骨組織内部を観察することに挑戦した。

骨組織の生体二光子励起顕微鏡観察

1. 二光子励起顕微鏡はなぜ生きた組織の観察に適しているか？

二光子励起顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡観察（共焦点レーザー顕微鏡も含む）で用いる励起光の半分のエネルギー（=2 倍の波長）を

持ったレーザー光を、細かいパルス状に放出したものを励起光源に用いる。パルス状の光子はフォーカスで一点に集められ密度が高い状態となるため、焦点平面でのみ二光子励起 [= 通常 (一光子励起) では光子 1 個で励起する蛍光分子を、光子 2 個分で励起すること] が起こりうる⁹⁾。このため、二光子励起顕微鏡の特長として以下が挙げられる⁶⁾⁷⁾。

(1) 高い z 軸分解能：焦点平面のみでしか励起が起こらない [その他の z 軸平面では (通常の励起に必要な半分のエネルギーの) 光子が当たっているものの励起には至らない]。

(2) 高い組織透過性：励起光として通常の半分のエネルギー (2 倍の波長) の近赤外光 (通常は波長が 780~1,050nm) を用いるため、組織の深部まで励起光を到達させることができる [※テレビのリモコン (赤外線) は障子を通すが、紫外線は紙一枚で容易にカットできる]。

固定した組織・臓器は、薄切してプレパラートにすればあらゆる断面を観察することができるが (物理的スライス)、生きた丸ごとの組織の内部を観察するには、二光子励起顕微鏡を用いて深部組織で z 軸平面を変えて観察することが有用である (光学的スライス)。このため、生組織の観察手段として、二光子励起顕微鏡の有用性が国内外で示されてきた。例えば、動物の脳や分泌腺など臓器・組織を摘出して、培養液中で生かしながら二光子励起観察されてきた (tissue-explant two-photon imaging)^{8~10)}。

2. 「生体」二光子励起観察のメリット

免疫系は、特に細胞の動きが重要なシステムである。好中球やリンパ球が全身をくまなく遊走し、免疫組織内の微小環境で会合し互いに相互作用を行うことにより、適切な機能が維持されている。この細胞遊走は時空間的に精緻にコントロールされており、各細胞が適切な場所に適切な時間に存在しなければ、機能を十分に発揮できない。このような免疫系における統率さ

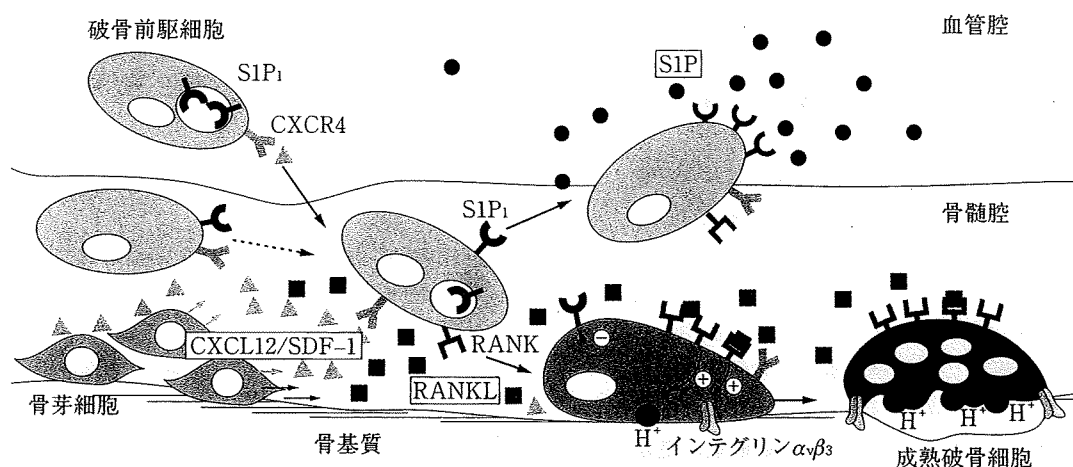
れた細胞遊走システムは、神経系での固定した軸索システム (“hard-wired”) と比較して、“soft-wired” と形容される¹¹⁾。この soft-wired ネットワークの解析のために、二光子励起観察をさらに一歩進めて、実験動物を生かしたままで顕微鏡に乗せて、注目する組織を観察する “intravital two-photon microscopy (生体二光子励起顕微鏡観察)” の手法が、2002 年頃より海外の複数の研究者によって開発された^{12~15)}。この方法論では、注目する組織のみならず個体自体が生きており、全身の血流や代謝が完全にインタクトに保たれた状態で観察できるため、極めて情報量が多い。

骨組織内での破骨前駆細胞の遊走・位置決めを観察するために、我々は骨内・骨髓腔の “intravital” imaging に取り組んだ^{16~18)}。この方法では、骨髓腔内を流れる豊富な血流が保たれているため、骨組織に定着している細胞の動きのみならず、血管から骨髓内へ細胞が流入したり、逆に血中へ還流していく様子を観察することができる。さらには、薬剤を尾静脈などから全身投与すると、血流を通して速やかに観察部位に到達させることができる。このような長所から、我々は骨の intravital imaging を行ったが、そもそも骨のように血流が豊富な組織は、取り出して生かしたまま観察することはかなり難しい。

生体二光子骨組織観察によって見えた、脂質メディエーター S1P による破骨前駆細胞の遊走と位置決めの制御

種々のケモカイン、脂質メディエーターを *in vitro* でスクリーニングした結果、破骨前駆細胞の遊走を刺激する幾つかの分子を得ていたが、中でも我々が注目したのは、現在リンパ球の遊走制御について重要な知見が得られているスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) である¹⁹⁾²⁰⁾。S1P は主に赤血球や血小板によって作られるため、血中に豊富に存在する。一方、組織には S1P を分解する S1P リアーゼがユビキタスに

図2 破骨前駆細胞の遊走と位置決め機構



単球系破骨前駆細胞は、骨髓内にあるケモカイン CXCL12/SDF-1 によって骨質内へ引き寄せられ、逆に血中の S1P によって血管内へと再還流する。この流入のバランスのうえに、骨表面に存在する破骨前駆細胞の数が決められており、一定数が RANKL の刺激を受けて成熟破骨細胞へと分化する。

略語：巻末の「今月の略語」参照

発現しており、一般に S1P は血中で高く、組織で低い濃度に保たれている。このため、S1P に対するケモタキシスは、基本的には細胞が組織から血中へ還流する際に作用すると考えられている。

我々は、破骨前駆細胞が S1P に対する受容体 (S1P₁) を発現しており、*in vitro* で S1P に対して強いケモタキシスが惹起されることを見いだした。この S1P に対する細胞遊走が *in vivo* でも見られるかどうかを確認するために、二光子励起顕微鏡を用いて骨組織内部の生体観察を行った¹⁶⁾¹⁷⁾。骨組織に存在する破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CX₃CR1-EGFP⁺) は定常状態ではほとんど動かなかったが、S1P₁ に対する強力なアゴニストである SEW 2871 を経静脈的に投与すると、急速に動きが大きくなり、血管へと移行していく様子が観察された (筆者の HP: <http://bioimaging.ifrec.osaka-u.ac.jp/> に動画が紹介されている)。これにより、*in vivo* の骨組織内でも、破骨細胞は確かに S1P₁ 刺激に反応して遊走能が亢進することが証明された。

さらに我々は、この「S1P に対する破骨前駆細胞の遊走」の生理意義を解明するために、破骨前駆細胞を含む単球系細胞 (CD11b⁺) に特異的に S1P₁ を欠損させたマウスの解析を行った。S1P₁ を欠損した破骨前駆細胞は骨組織にとどまりやすくなり、その結果として骨表面に接着する成熟破骨細胞の数が増加し、骨吸収側へと傾くことが分かった。S1P の濃度が血中で高く、S1P に対する遊走が一般に組織から血中への還流に寄与していることを考慮すると、以下の結論を得ることができる。

単球系の破骨前駆細胞は、血管から骨内部に流入するだけでなく、血中の S1P に対して遊走することにより血中へ再還流するシステムが存在する。この流入のバランスのうえに骨表面に存在する前駆細胞数が決められており、一定数が RANKL の刺激を受けて成熟する (図2)。これまで、RANKL などの分化誘導因子やその下流にある転写制御が破骨細胞研究の主要な課題であったが、この研究はその前の段階すなわち破骨前駆細胞が最終分化を遂げる場所 (骨) へと遊走・位置決めを行うシステムが、

破骨細胞分化・骨代謝の新たな制御点であるという新概念を提唱するものである。

今後の展開

1. 破骨前駆細胞の遊走・位置決めを標的とした新しい創薬

この新しい調節点は、骨吸収疾患に対する創薬ターゲットとしても極めて魅力的である。我々は骨粗鬆症のモデル動物を用いて、S1P受容体に対する強力なアゴニストの投与が、破骨前駆細胞を骨表面から引き剥がして血中へ再還流させ（結果として骨表面上の破骨細胞の数を減らし）、骨吸収を抑制することを示した。この結果は、S1Pによる破骨前駆細胞の遊走制御が治療標的としても有望なものであることを示している¹⁷⁾。これは、ビスホスホネート製剤など成熟破骨細胞を標的とした従来の骨吸収抑制薬とは異なった作用機序を持っているので、併用による相乗効果も期待でき、今後の臨床応用が期待される。

2. 骨組織の生体二光子励起観察の応用

骨組織は破骨細胞や骨芽細胞による骨代謝制御の場であるばかりでなく、B細胞をはじめとして種々の血液系細胞の発生・機能分化にとって重要な部位である。骨髓腔内での各細胞の挙動・位置決めとその分化制御や、血液系幹細胞が多能性を維持する特殊な環境（ニッチ）の同定、さらにはがんの骨転移のように本来骨にいない細胞がいかにして骨に到達するのか（誰が手助けするのか）など、骨組織・骨髓腔に関しては解明されるべき課題が数多くある。我々が開発した二光子励起顕微鏡を用いた骨の生体イメージングの方法論は、これら残された疑問を解決する強力な手段となると考える。

文 献

- Teitelbaum SL: Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508, 2000.
- Teitelbaum SL, et al: Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649, 2003.
- Takayanagi H: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7: 292-304, 2007.
- Lorenzo J, et al: Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29: 403-440, 2008.
- Goeppert-Mayer M: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 9: 273-295, 1931.
- Denk W, et al: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73-76, 1990.
- Denk W, et al: Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18: 351-357, 1997.
- Helmchen F, et al: Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2: 932-940, 2005.
- Takahashi N, et al: Exocytic process analyzed with two-photon excitation imaging in endocrine pancreas. *Endocr J* 54: 337-346, 2007.
- Takahashi N, et al: Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 297: 1349-1352, 2002.
- Huang A Y, et al: Illuminating the landscape of *in vivo* immunity: insights from dynamic *in situ* imaging of secondary lymphoid tissues. *Immunity* 21: 331-339, 2004.
- Stoll S, et al: Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296: 1873-1876, 2002.
- Miller MJ, et al: Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296: 1869-1873, 2002.
- Bousso P, et al: Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296: 1876-1880, 2002.
- von Andrian UH: Immunology. T cell activation in six dimensions. *Science* 296: 1815-1817, 2002.
- Germain RN, et al: Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune sys-

-
- tem get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev* 221: 163–181, 2008.
- 17) Ishii M, et al: Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458: 524–528, 2009.
- 18) Klauschen F, et al: Quantifying cellular interaction dynamics in 3-D fluorescence microscopy data. *Nat Methods* 4: 1305–1311, 2009.
- 19) Rosen H, et al: Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5: 560–570, 2005.
- 20) Cyster JG: Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23: 127–159, 2005.
-

Migration and Localization of Osteoclast Precursors Visualized by
Living Bone Imaging Using Intravital Two-photon Microscopy

Masaru Ishii

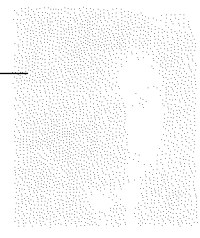
Laboratory of Biological Imaging, WPI-Immunology Frontier Research Center,
Osaka University



日本医学会雑誌 加付
第 1 巻 第 1 号 第 1 頁

表 題

著 者 名



（ここに表題と著者名の記入欄が複数行にわたって設けられている。本文の表題と著者名は、この欄に記入される。）

週刊
医学のあゆみ

別 刷

第 卷・第 号： 年 月 日号